

## Method for the temperature-dependent immobilisation of biocatalysts and tissue cells on solid, biocompatible carrier materials

Patent Number: DE4323487

Publication date: 1995-01-19

Inventor(s): BAYERL SYBILLE DR (DE); BAYERL THOMAS DR (DE); BRAUNSCHWEIG THOMAS DR (DE)

Applicant(s): BAYERL SYBILLE DR (DE); BAYERL THOMAS DR (DE); BRAUNSCHWEIG THOMAS DR (DE)

Requested Patent:  DE4323487

Application Number: DE19934323487 19930714

Priority Number(s): DE19934323487 19930714

IPC Classification: C12N11/00; C12N9/00; C12N5/00; C07K17/00; C12N11/14

EC Classification: C12N11/04, C12N11/14, C12M1/40

Equivalents:

### Abstract

Method for the functional immobilisation of enzymes, proteins, peptides and whole cells on solid carrier materials by means of electrostatic interaction between a biocompatible surface coating on the solid and the adsorbate which is to be immobilised. Modern industrial applications of biocatalysis frequently require the immobilisation of enzymes or whole cells on solid carrier materials in the bioreactor with minimal losses of enzymatic activity. Biocompatible surfaces and binding mechanisms which have a minimal effect on the natural state of the enzyme are necessary for this purpose. The method is aimed at the low-cost and simple preparation and use of biocompatible surface coatings on the carrier material by the means of lipid bilayers for the immobilisation, and the utilisation of the physicochemical properties of the surface coating for the control, adsorption and desorption of the enzymes. Carrier materials are completely and stably enveloped by a lipid bilayer by adsorption of very small monolayer phospholipid membrane vesicles on the solid surface. The enzyme to be immobilised is subsequently washed into the bioreactor and can adsorb on the lipid bilayer by coulomb interaction without significant loss of activity. The adsorption characteristics of the surface with regard to the enzymes can be influenced by the temperature.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



# Offenlegungsschchrift

⑯ DE 43 23 487 A 1

⑯ Int. Cl. 6:  
**C 12 N 11/00**  
C 12 N 9/00  
C 12 N 5/00  
C 07 K 17/00  
// C12N 11/14

⑯ Aktenzeichen: P 43 23 487.9  
⑯ Anmeldetag: 14. 7. 93  
⑯ Offenlegungstag: 19. 1. 95

DE 43 23 487 A 1

⑯ Anmelder:  
Bayerl, Sybille, Dr., 85757 Karlsfeld, DE; Bayerl, Thomas, Dr., 85757 Karlsfeld, DE; Braunschweig, Thomas, Dr., 04279 Leipzig, DE

⑯ Erfinder:  
gleich Anmelder  
⑯ Entgegenhaltungen:  
DE 37 33 303 A1  
WO 92 21 748  
Chemical Abstract: Vol.107,1987,Ref.: 130471t;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verfahren zur temperaturabhängigen Fixierung von Biokatalysatoren und Gewebezellen auf festen, biokompatiblen Trägermaterialien

⑯ Verfahren zur funktionellen Immobilisierung von Enzymen, Proteinen, Peptiden und ganzen Zellen auf festen Trägermaterialien mittels elektrostatischer Wechselwirkung zwischen einer biokompatiblen Oberflächenbeschichtung des Festkörpers und dem zu fixierenden Adsorbat. Moderne technische Anwendungen der Biokatalyse erfordern häufig die Immobilisierung von Enzymen oder ganzen Zellen auf festen Trägermaterialien im Bioreaktor mit möglichst geringen Verlusten an enzymatischer Aktivität. Biokompatible Oberflächen sowie Bindungsmechanismen, die den nativen Zustand des Enzyms möglichst wenig beeinflussen, sind hierfür erforderlich.

Ziel des neuen Verfahrens ist die kostengünstige und einfache Präparation und Anwendung von biokompatiblen Oberflächenbeschichtungen des Trägermaterials mittels Lipiddoppelschichten zur Immobilisierung und die Ausnutzung der physiko-chemischen Eigenschaften der Oberflächenbeschichtung zur Steuerung, Adsorption und Desorption der Enzyme.

Trägermaterialien werden durch Adsorption sehr kleiner, einschichtiger Phospholipid-Membranvesikel auf der Festkörperoberfläche mit einer Lipiddoppelschicht vollständig und stabil umschlossen. Das zu fixierende Enzym wird anschließend in den Bioreaktor eingespült und kann auf der Lipiddoppelschicht durch Coulomb Wechselwirkung ohne signifikanten Aktivitätsverlust adsorbieren. Die Adsorptionscharakteristik der Oberfläche bezgl. der Enzyme kann durch die Temperatur beeinflußt werden.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11. 84 408 063/277

DE 43 23 487 A 1

## 1. Stand der Technik

Die Fixierung von Enzymen (d. h. biokatalytisch wirksamen Proteinen) auf geeigneten Trägermaterialien zur Katalysierung von Bioreaktionen unter den kontrollierten Bedingungen (u. a. pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffpartialdruck, Viskosität) eins nach dem Oberflächenprinzip arbeitenden Bioreaktors ist ein zentrales Problem der Biotechnologie (s. z. B. Präve, P. et al. "Fundamentals of Biotechnology", Kap. 12.4 und Kap. 6, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim, (1987)). Die Immobilisierung der Enzyme ist deshalb so wichtig, um einerseits ihre optimale katalytische Aktivität über lange Zeiträume sicherzustellen und andererseits ihre Vermischung mit dem Reaktionsmedium zu verhindern. Letzteres würde sonst zum Verlust des Enzyms und zu einem höheren technischen Aufwand bei der Produktaufarbeitung (Reinigung) führen.

Als Trägermaterialien zur Fixierung in Bioreaktoren wird eine Vielzahl von Feststoffen verwendet, u. a. Glas, Keramik, Silica Gel, Kunststoffe, Collagenverbindungen, Stärkeverbindungen, Polymere. Die Form dieser Träger im Bioreaktor variiert ebenfalls stark, neben Platten, Fasern und Hohlfasern sind Hohlkugeln, Folien und Membranen gebräuchlich. Die Fixierung der Enzyme auf diesen Trägern erfolgt entweder durch Adsorption, chemische Bindungen (kovalent, ionogen, immunologisch) oder Einschluß.

Ein wichtiges Problem bei der Immobilisierung der Enzyme ist die Gefahr der teilweisen oder vollständigen Denaturierung derselben durch den Kontakt mit der Trägeroberfläche und der damit verbundene Verlust von katalytischer Aktivität. Dies ist besonders gravierend, wenn anorganische Trägermaterialien in direkten Kontakt mit dem Enzym kommen. Aber auch organische Träger wie natürliche Polymere (z. B. Dextran) können in manchen Enzymen Konformationsumwandlungen mit daraus resultierender Reduktion der enzymatischen Aktivität induzieren. Um dieses Problem bei anorganischen Trägern in den Griff zu bekommen, wird in jüngster Zeit vermehrt mit sogenannten biokompatiblen Oberflächen gearbeitet. Diese werden durch Beschichtung des Trägers mit organischen Filmen aus einem Material, welches bei Kontakt mit dem Enzym keine Konformationsumwandlungen in demselben induziert (biokompatibel), erzeugt.

Ein weiterer Nachteil der bisherigen Verfahren zur Enzymfixierung ist die zumeist technisch aufwendige Art der Fixierung. Diese muß i. a. außerhalb des Bioreaktors durchgeführt werden und ist oft irreversibel Natur, d. h. das Enzym kann entweder gar nicht oder nur unter Verlust seiner enzymatischen Aktivität von der Oberfläche wieder entkoppelt werden. Diese Option der gezielten Kopplung bzw. Entkopplung des Enzyms an/von der Trägeroberfläche ist jedoch aus prozeßtechnischer Hinsicht sehr vorteilhaft.

Das neue Verfahren soll einerseits eine optimale Biokompatibilität der Trägeroberflächen garantieren und weiterhin die Option bieten, die Kopplung bzw. Entkopplung des Enzyms mit der biokompatiblen Oberfläche durch Veränderung der Temperatur im Bioreaktor gezielt zu steuern.

Anorganische Festkörper wie z. B. Silizium oder Siliziumdioxid können mit einer ca. 5 nm dicken, bimolekularen Schicht aus amphiphilen Molekülen (im folgenden Bilayer genannt) beschichtet werden (Tamm, L. "Supported Phospholipid Bilayers", Biophysical Journal (Biophys. Soc. USA) 47, 105–113, (1985)). Das Resultat ist ein sogenannter Solid Supported Bilayer (SSB), wie

er schematisch in Abb. 1 gezeigt ist. Die Dicke des SSB ist ca. 5 nm und die Dicke der Wasserschicht zwischen Festkörperoberfläche und Bilayer ist 1,5 bis 2,0 nm (Johnson et al., "Structure of an adsorbed DMPC bilayer measured with specular reflection of neutrons", Biophysical Journal 59, 289–294, (1991)). Zur Beschichtung werden Phospholipidmoleküle, die Hauptkomponenten jeder tierischen Zellmembran, verwendet. Durch diese Beschichtung wird die anorganische Oberfläche vollständig biokompatibel, d. h. mit dieser Oberfläche in Kontakt kommende Proteine denaturieren nicht. Die physikalischen Eigenschaften derartiger Bilayer-Beschichtungen und ihre Herstellung im Labormaßstab wurden in den letzten Jahren eingehend untersucht (s. Naumann, C. et al., "Y-Y phase transition behavior of single phosphatidylcholine bilayers on a solid support studied by DSC, NMR and FT-IR", Biophysical Journal 63, 1314–1319 (1992) sowie Bayerl, T. M and M. Bloom, "Physical properties of single phospholipid bilayers adsorbed to micro glass beads", Biophysical Journal 58, 357–362, (1990)). Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeiten ist die Erkenntnis, daß die Bilayer-Beschichtungen für Zeiträume von Wochen bis Monaten stabil sein können und die gesamte Oberfläche des Trägermaterials bedecken. Weiterhin wurde gezeigt, daß die strukturellen und dynamischen Eigenschaften dieser Bilayer denen natürlicher Lipidmembranen sehr ähnlich sind.

Verwendet man zur Beschichtung statt dem zwitterionischen und damit nach außen elektrisch neutralen Lezithin (das in tierischen Zellen am häufigsten vorkommende Phospholipid) eine binäre Mischung aus Lezithin und einem Lipid mit negativer Ladung (z. B. Phosphoserin oder Phosphoglycerol) erhält man eine negativ geladene Oberfläche. Die Verteilung der Oberflächenladung hängt nun vom Mischungsverhalten der beiden Phospholipidkomponenten ab (Lee, A.G., Biochim. Biophys. Acta 472 (1977) 237–344).

Bei regulären Mischungsverhalten ist die Bildung von Lipiddomänen (Cluster) mit hoher negativer Oberflächenladung im kristallinen Phasenzustand möglich (infolge teilweiser Entmischung, Sackmann, E., "Biophysics", Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H. (eds.), pp 425–457, Springer Verlag Berlin, 1983). Diese Domänen sind durch ihre hohe Oberflächenladung in der Lage, Proteine mit entgegengesetzter (positiver) Ladung durch Coulomb Wechselwirkung fest zu binden (Johnson et al., "Coupling of spectrin and polylysine to phospholipid monolayers studied by specular reflection of neutrons", Biophysical Journal 60, 1017–1025, (1991)). Eine schematische Darstellung einer solchen Bindung wird in Abb. 2 gegeben. Hingegen werden negativ geladene Proteine abgestoßen und somit eine selektive Bindung von Proteinen nach ihrem Ladungszustand ermöglicht. Wird nun der kristalline Phasenzustand nach der Bindung des Proteins durch Temperaturerhöhung in den flüssig-kristallinen Zustand überführt (Phasenübergang erster Ordnung bei der Phasenübergangstemperatur  $T_m$ ), zersetzen sich die Domänen infolge einsetzender lateraler Diffusion der einzelnen

Phospholipidmoleküle und die Oberflächenladung wird über die gesamte beschichtete Oberfläche verteilt. Der daraus resultierende drastische Abfall der lokalen (auf eine Domäne bezogenen) Oberflächenladungsdichte bewirkt eine Entkopplung des bis dahin gebundenen Proteins. Damit ist die Möglichkeit gegeben, durch Veränderung eines Parameters (der Temperatur) eine selektive Kopplung und Entkopplung von Proteinen bezüglich einer biokompatiblen Oberfläche (d. h. ohne signifikante Denaturierung der Proteine) zu erreichen.

Domänenbildung bzw. Domänenzerfall sind reversible Vorgänge, damit kann der (Ent)kopplungsprozeß beliebig oft durch Temperaturveränderung wiederholt werden.

Auch eine Beschichtung des Festkörpers mit positiver Oberflächenladung des Bilayers kann realisiert werden. Hierzu verwendet man binäre Mischungen aus Lezithin mit einem amphiphilen, lipidähnlichen Molekül mit positiver Ladung (z. B. di-dodecyldimethyl-ammoniumbromid). Damit sind mit dem Verfahren, je nach Zusammensetzung des zur Beschichtung verwendeten Bilayers, sowohl positiv wie auch negativ geladene Proteine selektiv an eine biokompatible Oberfläche koppelbar und (bei entsprechender Temperaturerhöhung auf Werte oberhalb von  $T_m$ ) wieder gezielt entkoppelbar.

Die Phasenübergangstemperatur  $T_m$  (d. h. die "Schalttemperatur" für die zwei Zustände des Bilayers) ist von der Wahl der Phospholipidkomponenten abhängig und kann zwischen  $-20^\circ\text{C}$  bis  $+90^\circ\text{C}$  variiert werden. Für Proteinanwendungen ist insbesondere der Temperaturbereich  $0^\circ\text{--}40^\circ\text{C}$  interessant, der durch eine Vielzahl von binären Phospholipidmischungen (z. B. durch eine Mischung von 1,2-di-*la*idoyl-sn-glycero-3-phosphocholine mit 1,2-di-*my*ristoyl-sn-glycero-phosphoglycerol) problemlos realisiert werden kann.

### 3. Beispiele

#### 3.1 Immobilisierung wasserlöslicher Enzyme in einem Wirbelschicht-Bioreaktor

Als Substrat für die Bilayer-Beschichtung werden Kugeln aus Silikat ( $\text{SiO}_2$ ) oder aus Glas verwendet, die in Durchmessern von  $1\text{--}40\text{ }\mu\text{m}$  kommerziell verfügbar sind. Eine Vergrößerung der aktiven, beschichteten Oberfläche kann durch Verwendung von porösen Silikakugeln (sogenannte Silikagele) erreicht werden.

Die Beschichtung des Trägermaterials erfolgt direkt im Bioreaktor. Hierzu wird das Trägermaterial zunächst in einem gepufferten Medium ( $\text{pH} \approx 7$ ) im Bioreaktor dispergiert. Die zur Beschichtung verwendete Lipidmischung, z. B. durch eine Mischung von 1,2-di-*la*idoyl-sn-glycero-3-phosphocholine mit 20 mol-% 1,2-di-*my*ristoyl-sn-glycero-phosphoglycerol ( $T_m = 10\text{--}12^\circ\text{C}$ ) wird durch Ultraschallbehandlung der Lipiddispersion im gepufferten Medium ( $\text{pH} \approx 7$ ) zu sehr kleinen, unilamellaren Vesikeln verarbeitet. Diese werden dann bei Temperaturen oberhalb von  $T_m$  in den Wirbelschicht-Reaktor gegeben und mit dem dispergierten Trägermaterial verrührt. Dabei fusionieren die kleinen Vesikel spontan auf der Oberfläche des Trägermaterials (bei Zusammensetzen mit diesem) und bilden den gewünschten Lipidfilm (Bilayer). Überschüssige Vesikel können z. B. durch Sedimentation des beschichteten Trägermaterials aus dem Überstand abgetrennt werden. Danach wird die Temperatur des Bioreaktors auf Werte unterhalb von  $T_m$  reduziert. Das Trägermaterial ist nun bereit für die Kopplung des gewünschten katalytischen Enzyms (mit

positiver Ladung). Letzteres kann nun in den Reaktor eingespült werden und wird unmittelbar von dem Trägermaterial durch Coulomb-Wechselwirkung gebunden und damit immobilisiert. Da diese Immobilisierung auf einer biokompatiblen Oberfläche (die der Oberfläche einer natürlichen Membran weitgehend ähnelt) erfolgt, ist keine signifikante Denaturierung (und damit Verlust an katalytischer Aktivität) zu erwarten. Die Bindung an die Oberfläche des Trägermaterials ist *ca. fest* genug, um ein Ablösen des Enzyms bei Verwirbelung (Rühren) im Reaktor zu verhindern.

Eine spätere Trennung des immobilisierten Enzyms von dem Reaktionsgemisch ist einfach durch Sedimentation oder Zentrifugation zu erreichen. Soll hingegen das Enzym von dem Träger entkoppelt werden (z. B. zur Aufarbeitung oder wegen eines Enzymwechsels im Reaktor), ist dies durch Temperaturerhöhung auf Werte oberhalb von  $T_m$  und anschließender Sedimentation des Trägers realisierbar.

#### 3.2 Immobilisierung wasserlöslicher Enzyme oder ganzer Zellen in Festbett-(Submersreaktoren) oder Hohlfiber-Bioreaktoren

Hierzu ist ein geschichtetes Trägermaterial aus Glas oder Silika im Reaktor erforderlich. Die Geometrie kann entweder planar (Platten) oder gekrümmt (z. B. Hohlfiber) sein. Die Beschichtung mit dem Bilayer erfolgt analog zu dem in 3.1 gegebenen Beispiel. Anschließend kann das zu fixierende Enzym oder Gewebematerial eingespült werden. Temperaturabsenkung auf Werte unterhalb von  $T_m$  bewirkt dann die Kopplung an die biokompatible Oberfläche des Trägermaterials. Mit dieser Art der Fixierung können u. a. auch wachstumsgekoppelte Bioreaktionen im Bioreaktor (trotz Zellimmobilisierung) durchgeführt werden, da neu entstehendes Zellmaterial spontan an der Oberfläche gebunden wird (bzw. gebunden bleibt).

Die Produktaufarbeitung ist besonders einfach, da die Zellen durch Temperaturerhöhung ( $T > T_m$ ) vom Träger entkoppelt und aus dem Bioreaktor gespült werden können.

#### 4.3 Anwendung wasserunlöslicher Enzyme in Bioreaktoren

Das neue Verfahren gestattet auch die Anwendung von Enzymen in Bioreaktionen, die bisher aufgrund ihrer Lösungseigenschaften (z. B. Hydrophobizität) als nicht geeignet für Bioreaktoranwendungen galten.

Derartige Enzyme benötigen häufig die teilweise Einbettung in den hydrophoben Bereich einer Membran zur Erreichung ihrer enzymatischen Aktivität (ein Beispiel unter vielen ist das Cytochrom P-450 aus tierischen Leberzellen). Hierzu werden die Enzyme zunächst außerhalb des Bioreaktors in kleine, unilamellare Vesikel funktionell rekonstituiert (z. B. durch Detergenz-Dialysetechnik oder mittels Extrusion des Lipid-Protein-Gemisches durch Polycarbonatmembranen). Die rekonstituierten Vesikel werden anschließend in Reaktoren wie unter 4.1 oder 4.2 beschrieben bei Temperaturen oberhalb von  $T_m$  eingespült und fusionieren auf dem Trägermaterial. Bei Verwendung von kugelförmigen Trägern ist die gesamte Präparation auch außerhalb des Reaktors möglich. Anschließend wird dann das Reaktionsgemisch in den Reaktor beladen. Die Immobilisierung der Enzyme innerhalb der zur Beschichtung verwendeten Membran ermöglicht einerseits deren enzymatische

Aktivität während der Bioreaktion und verhindert andererseits den Übergang des katalytischen Enzyms in das Reaktionsgemisch.

## Patentansprüche

5

1. Verfahren zur Fixierung von Enzymen oder ganzen Zellen auf Festkörpern, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lipid-Doppelschicht (Bilayer) auf der Festkörperoberfläche adsorbiert oder gebunden wird und damit eine biokompatible Oberfläche erzeugt wird.
2. Verfahren nach 1.1, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Beschichtung verwendete binäre Lipidmischung eine Lipidspezies mit elektrisch positiver oder negativer Überschlußladung enthält.
3. Verfahren nach mindestens einem der vorangegangenen Punkte, dadurch gekennzeichnet, daß das Mischungsverhalten der zur Beschichtung verwendeten Lipidmischung zur Erzeugung von Oberflächenladungsmustern auf den beschichteten Festkörpern ausgenutzt wird.
4. Verfahren nach mindestens einem der vorangegangenen Punkte, dadurch gekennzeichnet, daß eine Kopplung oder Entkopplung des Enzyms von der bilayerbeschichteten Festkörperoberfläche durch Veränderung der Temperatur erzielt wird.
5. Verfahren nach mindestens einem der vorangegangenen Punkte, dadurch gekennzeichnet, daß der zur Beschichtung des Trägermaterials verwendete Lipid Bilayer als Matrix zur Einbettung bzw. funktionellen Rekonstitution von membranständigen (d. h. in den hydrophoben Bereich des Bilayer hineinreichenden) Enzymen, Proteinen oder Peptiden verwendet wird.
6. Verfahren nach mindestens einem der vorangegangenen Punkte, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Fixierung von Enzymen, Proteinen, Peptiden, ganzen Zellen oder Geweben an Trägermaterialien in Bioreaktoren bzw. Fermentern angewandt wird.
7. Verfahren nach mindestens einem der vorangegangenen Punkte, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Separation von Enzymen, Proteinen, Peptiden, ganzen Zellen oder Geweben aus Gemischen angewandt wird.

35

40

45

---

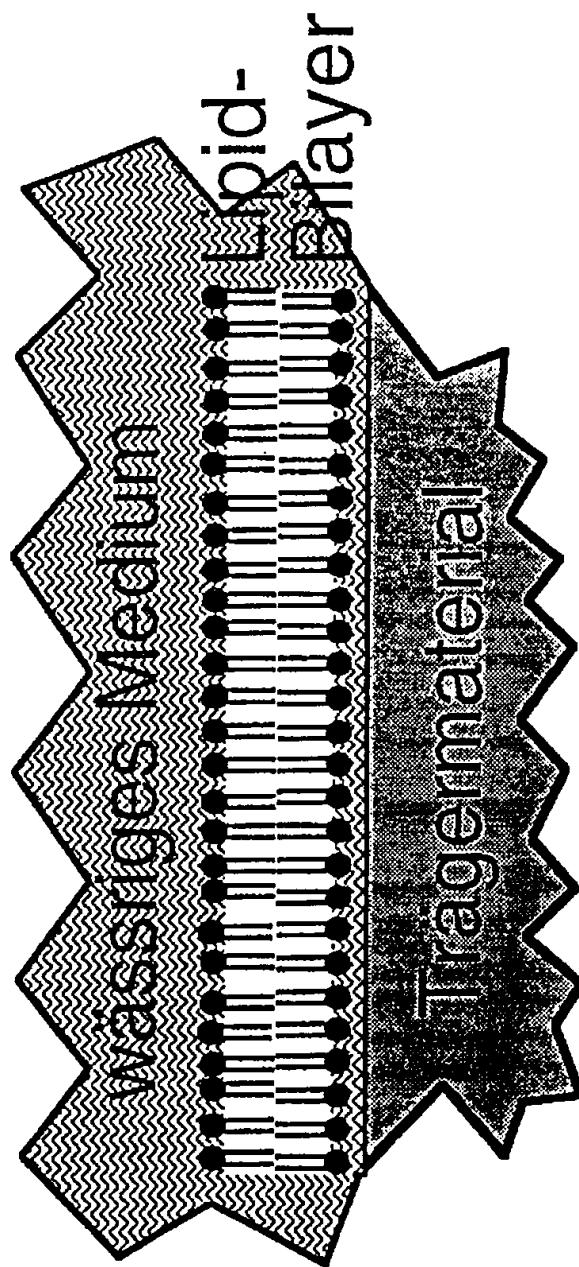
Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

50

55

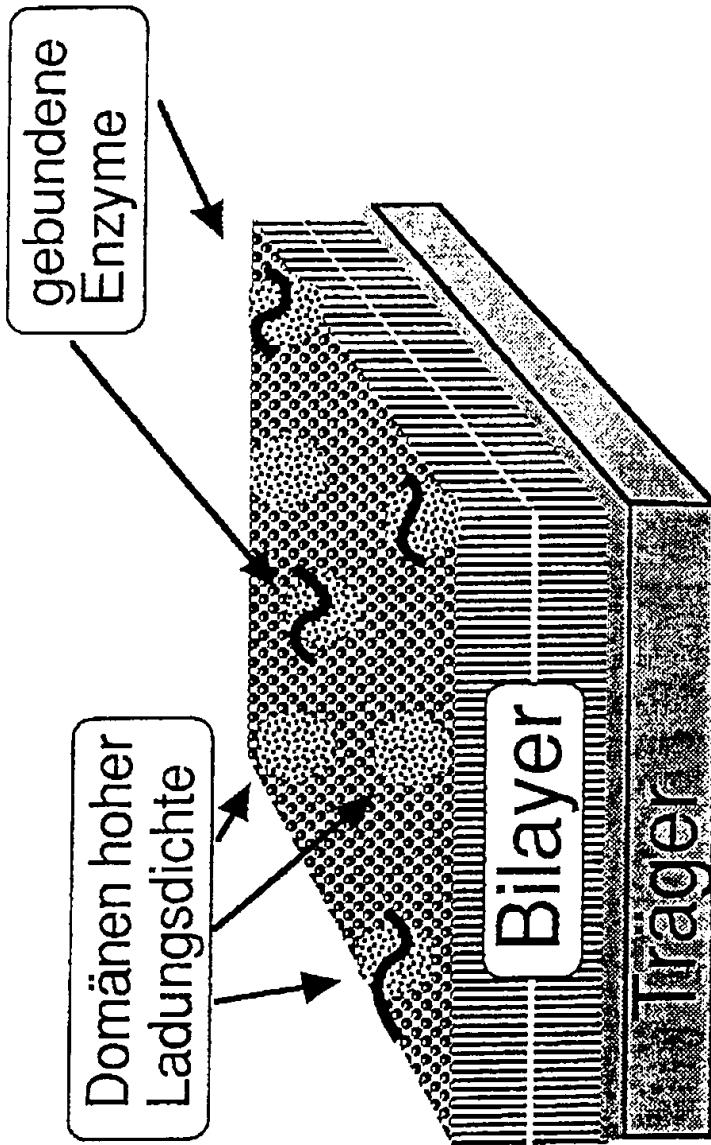
60

65



Verfahren zur Fixierung von Biotkatalysatoren und Gewebezellen auf festen, biokompatiblen Trägermaterialien zur Anwendung in Bioreaktoren

### Abbildung 1



Verfahren zur Fixierung von Biokatalysatoren und Gewebezellen auf festen, biokompatiblen Trägernmaterialien zur Anwendung in Bioreaktoren

**Abbildung 2**